

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE

Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : C12N 15/12, 15/62, 15/63 C07K 15/00, C12P 21/02 A61K 37/02		AI	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/15198	
			(43) Date de publication internationale: 5 août 1993 (05.08.93)	
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00073			(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).	
(22) Date de dépôt international: 26 janvier 1993 (26.01.93)				
(30) Données relatives à la priorité: 92/00806 27 janvier 1992 (27.01.92) FR			(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).				
(72) Inventeurs; et				
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): DENEFLE, Patrice [FR/FR]; 140, avenue Charles-Rouxel, F-77340 Pontault-Combault (FR). GUINET, Françoise [FR/FR]; 246, rue Marie-Alibert, F-69280 Marcy-l'Etoile (FR). LATTA, Martine [FR/FR]; 297, rue de Charenton, F-75012 Paris (FR). MURRY-BRELIER, Anne [FR/FR]; Résidence Le Renouveau, Bât. C, 22, avenue de la Gare, F-91570 Bièvres (FR).				

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale**Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications sera publiée si de telles modifications sont reçues.*

(54) Title: POLYPEPTIDES DERIVED FROM HUMAN AIV APOLIPOPROTEIN, PREPARATION AND USE THEREOF

(54) Titre: POLYPEPTIDES DERIVES DE L'APOLIPOPROTEINE AIV HUMAINE, LEUR PREPARATION ET LEUR UTILISATION

(57) Abstract

The present invention relates to polypeptides derived from human AIV apolipoprotein (AIVapo), nucleotide sequences coding for these polypeptides, preparation and use thereof.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des polypeptides dérivés de l'apolipoprotéine AIV humaine (apoAIV), les séquences nucléotidiques codant pour ces polypeptides, leur préparation et leur utilisation.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	CN	Guinée ~	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	CR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BC	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie			TN	Tchad

POLYPEPTIDES DERIVES DE L'APOLIPOPROTEINE AIV HUMAINE, LEUR PREPARATION ET
LEUR UTILISATION.

La présente invention concerne des polypeptides dérivés de l'apolipoprotéine AIV humaine (apoAIV), les séquences nucléotidiques codant pour ces polypeptides, 5 leur préparation et leur utilisation.

L'apolipoprotéine AIV (apoAIV) est une protéine constituée de 376 acides aminés, ayant une masse moléculaire de 46 000 daltons. Les séquences peptidiques et nucléotidiques de l'apoAIV, ainsi que la position des hélices sont représentées sur les séquences SEQ ID n° 1 et 2. L'apoAIV est un composant majeur des chylomicrons sécrétés dans la lymphe, mais elle présente la particularité d'être majoritairement sous forme non associée avec des lipoprotéines dans le plasma (R.B. Weinberg et Coll., 1983, J. Lipid. Research, 24 : 52-59). Par ailleurs, l'apoAIV plasmatique est polymorphe, bien que la nature de ce polymorphisme soit encore inconnue (G. Utermann et Coll., 1982, J. Biol. Chem. 257 : 501-507). Le rôle 10 physiologique de l'apoAIV demeure également assez peu connu. On sait qu'elle peut activer *in vitro* la lécithin-cholestérol-acyltransférase (LCAT) (Steinmetz et Coll., 1985, J. Biol. Chem., 260 : 2258-2264) et qu'elle peut, comme l'apolipoprotéine AI, 15 interférer avec la fixation des particules de HDL sur les cellules endothéliales aortiques bovines (Savion et Coll., 1987, Eur. J. Biochem., 257 : 4171-4178). Ces deux activités semblent indiquer que l'apoAIV intervient très vraisemblablement 20 comme médiateur du transport inverse du cholestérol.

La présente invention résulte du choix de la demanderesse d'utiliser l'apolipoprotéine AIV comme molécule cible pour l'étude des facteurs influençant le transport inverse du cholestérol. La présente invention repose plus précisément sur 25 l'utilisation de l'apoAIV pour la préparation de produits nouveaux, permettant, par de nouvelles thérapies, de lutter contre les hypercholestérolémies et les effets qui y sont associés, tels que l'athérosclérose.

Plus précisément, la présente invention fournit des polypeptides dérivés de l'apoAIV, et permet ainsi d'exploiter pharmacologiquement les propriétés de cette protéine. La présente invention a donc pour objet des polypeptides dérivés de l'apolipoprotéine AIV humaine. Il peut s'agir en particulier de polypeptides ayant une 30 stabilité plasmatique accrue par rapport à la protéine native (sensibilité plus faible aux mécanismes physiologiques d'élimination ou de dégradation).

une durée de vie plus longue. Il peut également s'agir de polypeptides ayant une activité stimulatrice de l'efflux du cholestérol cellulaire, et donc favorisant le transport inverse du cholestérol, conduisant à décharger les cellules ayant accumulé du cholestérol dans le contexte de la formation d'une plaque d'athérome. Il peut 5 également s'agir de polypeptides possédant seulement une ou plusieurs des propriétés de l'apoAIV. En particulier, il peut s'agir par exemple de polypeptides capables de lier les récepteurs cellulaires, mais ne possédant pas l'activité stimulatrice de l'efflux du cholestérol cellulaire. En outre, il peut également s'agir de polypeptides dépourvus des activités de l'apoAIV. De tels polypeptides peuvent en effet présenter 10 des utilités thérapeutiques (génération d'anticorps, études structure-fonction, etc.).

Préférentiellement, les polypeptides de l'invention sont capables de lier le récepteur HDL.

Encore plus préférentiellement, les polypeptides sont capables de lier le récepteur HDL et de stimuler un efflux de cholestérol.

15 Les polypeptides selon l'invention peuvent être de plusieurs types. Il peut s'agir, par rapport à l'apoAIV humaine, de dérivés de mutation ou de substitution, de dérivés de délétion ou de dérivés d'addition. Il est entendu que la présente invention couvre également les polypeptides comportant plusieurs types de modifications, tels que par exemple des dérivés de mutation et de délétion, des dérivés de délétion et 20 d'addition, etc.

Plus préférentiellement, l'invention a pour objet des polypeptides non-naturels dérivés de l'apolipoprotéine AIV humaine comprenant, par rapport à la séquence de l'apolipoprotéine AIV humaine SEQ ID n° 2, au moins une des modifications suivantes :

25 (a) une mutation ponctuelle portant sur un résidu fonctionnel, et/ou,
(b) une délétion d'une extrémité terminale d'au moins 10 acides aminés, et/ou,
(c) une délétion d'une hélice ou d'une paire d'hélices, et/ou,
(d) une partie additionnelle hétérologue possédant une activité biologique différente ou complémentaire de celle de l'apoAIV, ou une propriété de marqueur, de cibleur 30 ou de stabilisateur.

Dans un mode particulier, les polypeptides de l'invention comprennent au moins une modification selon (a) et (b).

Dans un autre mode particulier, les polypeptides de l'invention comprennent

Dans un autre mode particulier, les polypeptides de l'invention comprennent une modification selon (a), (b) ou (c) associée à une modification selon (d).

Les dérivés de mutation comprennent généralement une mutation ponctuelle (suppression d'un acide aminé, ou modification d'un acide aminé, ou remplacement d'un acide aminé par un autre), ou double (modification d'une paire d'acides aminés). Les mutations choisies tiennent compte de la position des résidus mutés dans leurs hélices respectives, et tendent a priori à modifier les groupements fonctionnels sans trop perturber la structure de l'hélice concernée, et donc du polypeptide. Au sens de la présente invention, on entend par résidu fonctionnel les résidus susceptibles d'être impliqués dans l'activité de l'apoAIV, soit au niveau de l'interaction avec le récepteur, soit au niveau de la transmission d'un signal (tel que par exemple la stimulation de l'efflux du cholestérol). Les résidus préférés sont généralement les résidus chargés, qui possèdent un effet potentiel dans l'interaction du polypeptide avec son récepteur. De tels résidus peuvent être remplacés par d'autres, apolaires, ou modifiés chimiquement par suppression ou ajout d'une charge. Les résidus glycosylés et les résidus impliqués dans la formation de ponts disulfure (cystéine) constituent d'autres résidus préférés.

Préférentiellement, les polypeptides de l'invention possèdent par rapport à l'apoAIV humaine telle que représentée sur la séquence SEQ ID n° 2 au moins une mutation sur l'un des résidus suivants : acide aspartique en position 5, 44, 106, 153 ; glutamine en position 37, 194 ; asparagine en position 39 ; lysine en position 73, 84, 103, 169, 178 ; acide glutamique en position 76, 81, 87, 99, 131, 164, 187, 230 ; alanine en position 22 ; proline en position 139, 161 ; et serine en position 154.

Plus préférentiellement, l'acide aspartique peut être remplacé par un résidu S, K, A, F ou G ; la glutamine par un résidu T, K ou F ; l'asparagine par un résidu A ou D ; la lysine par un résidu G, E, T, D, A, Y, H ou F ; l'acide glutamique par un résidu S, R, F, K, A, G, N, ou Q ; l'alanine par un résidu R ou E ; la proline par un résidu R ou G ; et la sérine par un résidu E ou R (les lettres correspondent à un acide aminé selon le code reconnu).

Les polypeptides de l'invention peuvent être des dérivés de délétion. Dans ce cas, la ou les délétions peuvent porter sur une extrémité de la protéine (C-terminale ou N-terminale). A cet égard, certains polypeptides de l'invention sont des fragments d'apoAIV, obtenus par délétion de parties importantes de la protéine.

- polypeptides P(Δ h9-10) : polypeptide possédant une délétion des hélices 9 et 10 telles que présentées sur la SEQ ID n° 2 (résidus P206 à A249), et sa version tag.
- 5 - polypeptides P(Δ h11-12) : polypeptide possédant une délétion des hélices 11 et 12 telles que présentées sur la SEQ ID n° 2 (résidus P250 à E289), et sa version tag.
- polypeptide P(Δ h11-12,L87M) : polypeptide possédant une délétion des hélices 11 et 12 telles que représentées sur la SEQ ID n° 2 (Δ h11-12), et une methionine au lieu d'une leucine en position 87 (L87M).
- 10 - polypeptides P(Δ h13-14) : polypeptide possédant une délétion des hélices 13 et 14 telles que présentées sur la SEQ ID n° 2 (résidus P290 à N333), et sa version tag.
- polypeptides P(Δ h5-6) : polypeptide possédant une délétion des hélices 5 et 6 telles que représentées sur la SEQ ID n° 2 (résidus P118 à R161), et sa version tag.
- 15 - polypeptide P(D44F) : polypeptide possédant une phénylalanine au lieu d'un acide aspartique en position 44.
- polypeptide P(D44A) : polypeptide possédant une alanine au lieu d'un acide aspartique en position 44.
- 20 - polypeptide P(D5S) : polypeptide possédant une sérine au lieu d'un acide aspartique en position 5.
- polypeptide P(D5K) : polypeptide possédant une lysine au lieu d'un acide aspartique en position 5.
- polypeptide P(K178Y) : polypeptide possédant une tyrosine au lieu d'une lysine en position 178.
- 25 - polypeptide P(K178A) : polypeptide possédant une alanine au lieu d'une lysine en position 178.
- polypeptide P(E230K) : polypeptide possédant une lysine au lieu d'un acide glutamique en position 230.

30 De tels polypeptides selon l'invention présentent un intérêt pharmaceutique important, notamment dans le traitement et/ou la prévention de l'athérosclérose. L'athérosclérose est une maladie qui se caractérise par la formation de plaques lipidiques ou fibro-lipidiques dans l'intima de l'aorte, des artères coronaires et de la carotide essentiellement. Ces plaques, plus ou moins calcifiées selon l'avancement de la maladie, peuvent entraîner une obstruction des artères et des complications graves telles que l'infarctus du myocarde ou l'AVC.

les artères de dépôts graisseux constitués essentiellement d'esters de cholestérol. Ces plaques provoquent alors un épaissement de la paroi artérielle, avec hypertrophie du muscle lisse, apparition de cellules spumeuses et accumulation de tissu fibreux. La plaque athéromateuse est très nettement en relief sur la paroi, ce qui lui confère un caractère sténosant responsable des occlusions vasculaires par athérome, thrombose ou embolie, qui surviennent chez les patients les plus atteints.

La formation d'une plaque d'athérome résulte donc de la conjugaison de différents facteurs, (i) un excès de cholestérol plasmatique, dont proviennent les dépôts artériels, et (ii) un défaut de régulation entre influx et efflux de cholestérol au niveau des tissus périphériques, en faveur d'une accumulation intracellulaire.

Compte tenu de leur propriétés, les polypeptides selon l'invention peuvent notamment permettre de ralentir la formation des plaques d'athérome, d'induire la régression des plaques d'athérome, et de diminuer le risque d'incidence d'accidents coronariens.

Les polypeptides de l'invention peuvent être obtenus de différentes façons, et notamment par voie chimique et/ou génétique.

Dans le cas de la préparation par voie chimique, les polypeptides de l'invention peuvent être obtenus soit entièrement par synthèse chimique, soit par modifications chimique ou enzymatique de la protéine native. Dans ce dernier cas, différents agents chimiques ou enzymatiques peuvent être utilisés, permettant de modifier des résidus (dérivés de mutation), de marquer des résidus (dérivés d'addition) ou de fragmenter la protéine (dérivés de délétion). Parmi les agents chimiques permettant de modifier ou marquer des acides aminés, on peut citer plus particulièrement le sulfo-NHS-acétate, qui permet l'acylation des amines primaires et surtout des lysine ; le tétranitrométhane qui introduit un groupement nitrate sur les tyrosines, ou encore le N-bromo-succinimide qui oxyde les résidus tryptophane. Parmi les agents chimiques et enzymatiques permettant de couper des liaisons peptidiques, on peut citer plus particulièrement le bromure de cyanogène, le iodosobenzoate, la trypsine, la chymotrypsine, la thermolysine ou encore la proendopeptidase.

Comme indiqué plus haut, ces traitements peuvent être appliqués aussi bien sur le polypeptide produit d'une synthèse chimique que sur le polypeptide natif. De plus, ces traitements peuvent également être appliqués aux polypeptides obtenus par voie génétique, et de ce fait, comportant déjà certaines modifications.

Dans le cas de la préparation par voie génétique, les polypeptides de l'invention sont obtenus par modification au niveau des séquences nucléotidiques codantes, et expression desdites séquences dans un hôte cellulaire.

A cet égard, la présente invention a également pour objet les séquences nucléotidiques codant pour les polypeptides décrits plus haut. Il peut s'agir de séquences d'ADN, de séquences d'ARN, de séquences synthétiques, semi-synthétiques, hybrides, etc. Ces séquences peuvent être utilisées :

- pour la production des polypeptides de l'invention par expression dans un hôte cellulaire,
- 10 - comme composition pour des thérapies géniques,
- pour la réalisation de sondes marquées permettant l'identification de polypeptides apparentés ou la mise en évidence d'une expression des polypeptides de l'invention,
- 15 - pour la préparation de nouveaux vecteurs de clonage ou d'expression comportant ces séquences, ou encore,
- pour la préparation de nouvelles cellules eucaryotes ou procaryotes recombinantes ou d'animaux transgéniques contenant ces séquences ou ces vecteurs.

Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être obtenues à partir d'une séquence codant pour l'apoAIV, par différentes techniques telles que notamment par découpage génétique, mutagénèse, ou tout autre traitement altérant la structure des acides nucléiques. Les techniques les plus connues de l'homme du métier sont mentionnées ci-après dans les techniques générales de clonage. Le détail de la synthèse des séquences nucléotidiques de l'invention est donné dans la partie B/ des exemples. La séquence de l'apoAIV humaine utilisée dans l'invention a été obtenue à partir d'un clone génomique contenant le fragment KpnI-HindIII de la séquence du gène humain de l'apoAIV, qui contient la fin de l'intron 2, la totalité de l'exon 3 ainsi que la séquence 3' non traduite. Ce clone ne contenait donc pas, en particulier, les deux premiers exons du gène de l'apoAIV humaine (Elshourbagy et coll. J.B.C. (1987) 262:7973). La séquence complète a été obtenue par :

- synthèse chimique de l'extrémité 5' de la séquence de l'apoAIV, de sorte que ce fragment synthétique contienne les codons correspondant à la partie de la protéine mature codée par les deux premiers exons du gène humain, et également les premiers nucléotides de la région 5' de l'exon 3 s'étendant jusqu'au site BstEII ; puis,

- la liaison de ce fragment synthétique à un fragment d'ADN contenant le restant de la séquence du gène de l'apolipoprotéine AIV située après le site BstEII, utilisé pour effectuer la jonction au nucléotide près.

Le détail de ces étapes est donné dans la partie A/ des exemples.

5 La présente invention a également pour objet un procédé de préparation des polypeptides de l'invention décrits plus haut. Ce procédé consiste à réaliser les étapes suivantes :

- dans une première étape, on introduit dans une cellule une séquence nucléotidique telle que définie plus haut codant pour un polypeptide de l'invention,
- 10 - dans une deuxième étape, on cultive la cellule ainsi obtenue dans des conditions d'expression de ladite séquence nucléotidique et,
- dans une troisième étape, on récupère le polypeptide produit.

15 Plus particulièrement, lors de la première étape du procédé de l'invention, la séquence nucléotidique peut être introduite dans la cellule par différentes techniques. Notamment, l'introduction peut être effectuée par transformation, conjugaison, ou électroporation.

20 S'agissant de la transformation, différents protocoles ont été décrits dans l'art antérieur. En particulier, elle peut être réalisée en traitant les cellules entières en présence d'acétate de lithium et de polyéthylène glycol selon la technique décrite par Ito et al. (J. Bacteriol. 153 (1983) 163-168), ou en présence d'éthylène glycol et de diméthylsulfoxyde selon la technique de Durrens et al. (Curr. Genet. 18 (1990) 7). La transformation peut encore être effectuée selon la technique décrite par Dagert et al. (Gene 6 (1979) 23-28) par traitement avec une solution de CaCl₂ puis choc thermique. Un protocole alternatif a également été décrit dans la demande de brevet 25 EP 361 991.

25 S'agissant d'électroporation, la technique décrite par Karube et al. (FEBS Letters 182 (1985) 90) peut avantageusement être utilisée.

Le choix de l'une ou de l'autre de ces méthodes est établi notamment en fonction de l'hôte choisi.

30 Parmi les hôtes eucaryotes utilisables dans le procédé de l'invention, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia pastoris, Schwanniomyces, ou Hansenula. S'agissant de cellules animales, on peut

utilisés dans la présente invention, on peut citer plus particulièrement Aspergillus ssp. ou Trichoderma ssp.

Parmi les hôtes procaryotes utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer les bactéries suivantes E.coli, Bacillus, ou Streptomyces.

5 Dans un mode préféré de l'invention, le procédé est mis en oeuvre en utilisant comme cellule hôte une cellule procaryote.

Encore plus préférentiellement, le procédé de l'invention est mis en oeuvre en utilisant comme cellule hôte la bactérie E.coli.

10 Généralement, la séquence nucléotidique utilisée est une séquence génomique, une séquence d'ADNc, une séquence séquence hybride, etc. Pour une meilleure mise en oeuvre de l'invention, on préfère cependant utiliser un ADNc (Cf exemple A/). Par ailleurs, cette séquence nucléotidique comprend généralement une région de démarrage de la transcription et de la traduction jointe à l'extrémité 5' terminale de la séquence codante, de façon à diriger et à réguler la transcription et la 15 traduction de ladite séquence. Le choix de ces régions peut varier en fonction de l'hôte utilisé. En particulier, chez les bactéries telles que E.coli, on peut utiliser le promoteur de l'opéron tryptophane (P_{trp}), ou les promoteurs gauche et droit du bactériophage lambda (PL, PR) ou encore le promoteur du gène 10 du bactériophage T7.

20 Par ailleurs, la séquence nucléotidique fait préférentiellement partie d'un vecteur, qui peut être à réplication autonome ou intégratif. Plus particulièrement, des vecteurs à réplication autonome peuvent être préparés en utilisant des séquences à réplication autonome chez l'hôte choisi. A titre d'exemple, chez la levure, il peut s'agir d'origines de réplication dérivées de plasmides : pKD1 (EP 241 435) ou bien 25 de séquences chromosomiques (ARS) et chez la bactérie, il peut s'agir d'origines de réplication dérivées de plasmides (pBR322, pET3, etc). S'agissant des vecteurs intégratifs, ceux-ci peuvent être préparés par exemple en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur. A cet égard, l'utilisation d'ADNr permet une 30 intégration multiple de l'ADN exogène, et donc sa présence en plus grand nombre de copies par cellules.

Dans un mode préféré, la séquence nucléotidique comprend, en amont de la séquence codante, ou, le cas échéant, entre la région de démarrage de la transcription et de la traduction

polypeptide naissant dans les voies de sécrétion de l'hôte utilisé. Cette séquence "leader" peut être la séquence "leader" de l'apoAIV, mais il peut également s'agir d'une séquence hétérologue (issue d'un gène codant pour une autre protéine) ou même artificielle. Le choix de l'une de ces séquences est notamment guidé par l'hôte utilisé.

Les polypeptides de la présente invention peuvent ensuite être isolés du milieu de culture par toute technique connue de l'homme du métier. Plus particulièrement, la partie C/ des exemples décrit un procédé permettant de purifier dans les conditions natives, c'est-à-dire sans aucune étape de dénaturation, les polypeptides de l'invention.

Un autre objet de l'invention concerne des compositions pharmaceutiques comportant un ou plusieurs polypeptides selon l'invention ou une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon l'invention.

Préférentiellement, de telles compositions sont destinées au traitement ou à la prévention des affections liées aux hypercholestérolémies.

Encore plus préférentiellement, l'invention a pour objet des compositions pharmaceutiques comportant un ou plusieurs polypeptides selon l'invention, ou une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon l'invention, destinées au ralentissement de la formation de plaques d'athérome, et/ou à la régression des plaques d'athérome et/ou à la diminution des risques d'accidents coronariens.

De plus, la présente invention a également pour objet l'utilisation des polypeptides décrits ci-avant pour la réalisation de molécules de structure non-peptidique ou non exclusivement peptidique possédant le même type d'activité. A cet égard, l'invention concerne l'utilisation d'un polypeptide de l'invention tel que décrit ci-avant pour la préparation de molécules non-peptidiques, ou non exclusivement peptidiques, actives pharmacologiquement sur les niveaux plasmatiques de cholestérol, par détermination des éléments structuraux de ce polypeptide qui sont importants pour son activité, et reproduction de ces éléments par des structures non-peptidiques ou non exclusivement peptidiques. L'invention a aussi pour objet des compositions pharmaceutiques comprenant une ou plusieurs molécules ainsi préparées.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples suivants, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Structure et construction du plasmide pXL1697.

Figure 2 : Structure des plasmides pXL1872 et pXL1867.

Figure 3 : Structure des plasmides pXL1696 et pXL2051.

5 . TECHNIQUES GENERALES DE CLONAGE

Les techniques classiques de purification de plasmides, de préparation des cellules compétentes pour la transformation par la méthode au CaCl_2 , sont décrites dans le manuel de laboratoire : T. Maniatis et Coll., Molecular cloning, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory. Les séquences d'ADN ont été déterminées par la méthode de Sanger (Smith A.J.H., 1980, Methods in Enzymol. 65 : 499-559). Les protocoles de clonage dans M13 sont décrits (Messing et Coll. 1981, Nucleic Acid Res. 9 : 309-321). Les endonucléases de restriction (New England Biolabs) ont été utilisées selon les conseils du fabricant. Le tampon utilisé pour les ligatures a la composition suivante : Tris-HCl 50 mM, MgCl_2 10 mM, DTT 15 mM, ATP 1 mM, pH 7,5. Le 10 tampon de phosphorylation des oligonucléotides a la composition suivante : Tris-HCl 5 mM, MgCl_2 1 mM, DTT 0,6 mM, pH 7,5. La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodésoxynucléotides est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. (Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764) en utilisant le kit distribué par Amersham.

15 A - SYNTHESE ET ASSEMBLAGE DE LA SEQUENCE CODANTE DE L'APOLIPOPROTEINE AIV ET PREPARATION DES VECTEURS.

A1 - Synthèse et assemblage de la séquence codante de l'ApoAIV.

La séquence nucléotidique du gène de lapolipoprotéine AIV décrite dans la présente invention diffère des séquences de cDNA publiées précédemment (voir en particulier la liste des séquences cDNA publiée par C-Y. Yang, Z-W. Gu, I. Chong, W. Xiong, M. Rosseneue, H. Yang, B. Lee, A.M. Gotto et L. Chan, 1989, B.B.A., 1002 : 231-237). Notamment, la séquence codant pour le peptide signal de la protéine est absente, et, en amont du premier codon de la protéine mature a été placé un codon de démarrage de la traduction ATG. Celui-ci introduit donc une méthionine surréna- 25 raire en amont de la séquence de la protéine mature, et permet ainsi d'exprimer le gène codant uniquement pour la partie mature de la protéine. 30

D'autre part, cette séquence nucléotidique de l'apolipoprotéine AIV a été obtenue d'une manière originale par l'assemblage de quatre oligonucléotides qui ont été synthétisés par voie chimique et dont la taille est comprise entre 86 et 107 mer (SEQ ID n° 3-6). De plus, on peut remarquer sur la séquence des oligonucléotides que des extrémités cohésives *Xba*I et *Eco*RI ont été définies afin de permettre un assemblage en deux étapes de la séquence complète de l'apolipoprotéine AIV.

5 1. Synthèse des oligonucléotides

Les quatre oligodéoxynucléotides qui ont servi à l'assemblage du gène de l'apolipoprotéine AIV, ont été synthétisés par la méthode des phosphoramidites (L.J. 10 Bride et M.H. Caruthers (1983) *Tetrahedron Lett.* 24 : 245) au moyen du synthétiseur Bioresearch (Modèle 8600) selon les conseils des fabricants. Les oligonucléotides ont été purifiés sur gel d'acrylamide 15 %. Leur séquence est donnée sur les séquences SEQ ID n° 3-6.

15 2. Première étape d'assemblage

Les oligonucléotides ont été phosphorylés par traitement avec la T4 DNA kinase. Les oligonucléotides A et C ont été appariés respectivement avec les oligonucléotides B et D dans des conditions stoechiométriques. L'hybridation des oligonucléotides a été réalisée dans des tubes Eppendorf immergés dans un bêcher contenant environ 100 ml d'eau portée à 80°C que l'on laisse revenir à la température 20 du laboratoire.

Les fragments A-B et C-D ont été ligaturés en présence de T4 DNA ligase avec la forme réplicative du phage M13mp10 au préalable digérée par les enzymes *Xba*I et *Eco*RI.

25 La forme réplicative du bactériophage recombinant obtenu appelé pXL1695 (M13mp10ABCD) a servi à transfacter des bactéries TG1 rendues compétentes par la méthode au CaCl_2 .

Ce réplicon pXL1695 a été purifié, soit sous sa forme d'ADN simple brin et sa séquence a été vérifiée, soit sous sa forme d'ADN double brin réplicative pour la suite des constructions.

30 3. Deuxième étape d'assemblage

La forme réplicative de pXL1695 (M13mp10ABCD)

troisième exon du gène de l'apoAIV (N.A. Elhourbagy, J. Biol. Chem., 1987, 262 : 7973-7981) ont été respectivement digérés par XbaI et BstEII d'une part et EcoRI et BstEII d'autre part. Dans le cas de pXL1695, un fragment de 167 paires de bases a été purifié sur gel d'acrylamide. La forme réplicative du vecteur M13mp18amIV a été digérée par XbaI et EcoRI et un fragment d'environ 7 kb a été purifié sur gel d'agarose.

5 Les trois fragments ont été rassemblés et ligaturés en présence de T4 DNA ligase.

Après transfection de TG1, des clones contenant la forme réplicative 10 appelée pXL1696 ont été obtenus. La séquence codante complète du fragment XbaI-EcoRI ainsi cloné dans pXL1696 a été vérifiée. Ce fragment a ensuite été re-extrait de pXL1696 et ligaturé en présence d'un fragment EcoRI-HindIII, d'environ 3 kb provenant de pXL1694 et portant en particulier la fin de l'exon 3 du 15 gène de l'apoAIV humaine, et en présence également du vecteur M13mp19, coupé par les enzymes XbaI et HindIII.

Le vecteur recombinant ainsi obtenu, pXL1697, porte la totalité de la séquence codante de l'apoAIV (1132 bp) ainsi qu'un fragment génomique d'environ 2 kb correspondant à l'intron 3 du gène de l'apoAIV (figure 1).

Une mutagénèse dirigée effectuée avec le kit de mutagénèse Amersham 20 (RPN 1523) à l'aide de l'oligodeoxynucléotide synthétique Sq1087 : 5'-GCCCTTGGAGAGCTGAGGATCCCCTGGTGCCTGGCCCCA-3' a permis d'introduire sur pXL1697 un site BamHI immédiatement après le codon Stop (TGA) du gène de l'apoAIV. Le vecteur obtenu a été dénommé pXL1866.

A2 - Préparation des vecteurs portant la séquence de l'apoAIV.

25 1. Préparation du vecteur pXL1872.

Le vecteur pXL1866 décrit ci-dessus a été coupé par les enzymes XbaI et BamHI, et un fragment de 1,15 kb contenant la totalité de la séquence codante de l'apoAIV a été purifié sur gel d'agarose et religaturé dans M13mp18amIV pour donner le vecteur pXL1872 (figure 2).

30 2. Préparation du vecteur pXL1867.

Le vecteur pXL1866 a été coupé par NdeI et BamHI et un fragment de

vecteur d'expression résultant, pXL1867, contient donc la séquence codante de l'apolipoprotéine AIV sans aucun fragment résiduel de l'intron 3 provenant de la séquence génomique de l'apolipoprotéine AIV (figure 2).

3. Préparation du vecteur pXL1696.

5 Le fragment XbaI-EcoRI de 570 pb contenant la partie 5' de la séquence codante de l'apoAIV (résidus 1 à 189) a été excisé du vecteur pXL1872, purifié sur gel d'agarose et religaturé dans M13mp10 pour donner le vecteur pXL1696 (figure 3).

4. Préparation du vecteur pXL2051.

10 Le fragment EcoRI-BamHI de 577 pb contenant la partie 3' de la séquence codante de l'apoAIV (résidus 188 à 377) a été excisé du vecteur pXL1872, purifié sur gel d'agarose et religaturé dans M13mp19 pour donner le vecteur pXL2051 (figure 3).

15 B - GENERATION DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR LES POLYPEPTIDES DE L'INVENTION ET PRODUCTION DE CES POLYPEPTIDES.

B1 : Mutants réalisés à partir du vecteur pXL1872

1. Génération des vecteurs pXL1775, pXL1869 et pXL2168, et préparation des polypeptides P(ΔN13,R93G), P(ΔN13) et P(tagΔN13).

20 A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant : 5'-GACCAGGTGGCCACAGTGCATATGGACTACTTCAGCCAGCTG-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du vecteur pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis d'introduire un site NdeI ainsi qu'un codon ATG dans la séquence codante de l'apoAIV aux positions respectives 40 et 43, provoquant une déletion des 13 premiers acides aminés N-terminaux. Par ailleurs, lors de la vérification de séquence des dérivés obtenus, certains clones dont le clone pXL1799 portaient une mutation ponctuelle supplémentaire en position 280 sur la séquence. Cette mutation (C->G) a pour effet de changer

A partir du clone pXL1799 et d'un autre clone ne portant pas la mutation (C->G) supplémentaire, un fragment NdeI-BamHI de 1097 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a (AMS Biotechnology), lui même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

5 Deux vecteurs recombinants ont ainsi été obtenus : Le vecteur pXL1775, qui permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des 13 acides aminés N-terminaux ($\Delta N13$) et une glycine au lieu d'une arginine en position 93 (R93G); et le vecteur pXL1869, qui permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des 13 acides aminés N-terminaux ($\Delta N13$).

10 A partir du vecteur pXL1869, le vecteur pXL2168 a été construit, dans lequel la séquence codant pour le polypeptide P($\Delta N13$) a été fusionnée en 5' à une séquence codant pour le décapeptide tag MRGS(H)6. Pour cela, les 2 oligodéoxynucléotides suivants ont été synthétisés, en utilisant un synthétiseur d'ADN Biosearch 8600 :

15 Oligo A : 5'-TAATGCGTGGATCGCACCATCACCATCACCA-3'
Oligo B : 5'-TATGGTGATGGTGATGGTGGATCCACGCAT-3'
Les oligodéoxynucléotides A et B ont été hybridés, et le produit d'hybridation a été ligaturé avec le vecteur pXL1869, préalablement digéré par l'enzyme NdeI. Le vecteur ainsi obtenu, désigné pXL2168, code pour le polypeptide P($\Delta N13$) fusionné en N-terminal au décapeptide MRGS(H)6.

20 2. Génération des vecteurs pXL1766 et pXL2182, et préparation du polypeptide P($\Delta C44$) et de sa version tag.

A l'aide de l'oligodéoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :
5'-CTGAGGGACAAGGTCAACTGAGGATCCAGCACCTCAAGGAGAAAG-3',
une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis d'introduire un site BamHI ainsi qu'un codon TGA dans la séquence codante de l'apoAIV aux positions respectives 1000 et 997, provoquant une délétion des 44 acides aminés C-terminaux.

30 A partir d'un clone mutant (pXL1765) dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-BamHI de 1004 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a, lui même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL1766 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des 44 acides aminés C-terminaux ($\Delta C44$).

En suivant le protocole décrit en B1.1), le vecteur pXL2182 a été construit à 5 partir du vecteur pXL1766. Le vecteur pXL2182 ainsi obtenu permet d'exprimer à haut niveau le polypeptide P($\Delta C44$) fusionné en N-terminal au décapeptide MRGS(H)6.

3. Génération du vecteur pXL1774 et préparation du polypeptide P($\Delta C194$).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant : 10 5'-CTCAAGGGACGCCTTACGTGAGGATCCGACGAATTCCAAAGTC-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis d'introduire un site BamHI ainsi qu'un codon TGA dans la séquence codante de l'apoAIV aux positions respectives 553 et 550, provoquant 15 une délétion de 194 acides aminés du côté C-terminal.

A partir d'un clone mutant (pXL1798) dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-BamHI de 555 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a, lui même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

20 Le vecteur recombinant pXL1774 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des 194 derniers acides aminés ($\Delta C194$).

4. Génération du vecteur pXL1817 et préparation du polypeptide P($\Delta N182$).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant : 25 5'-GAGCTCAAGGGACGCCATATGCCCTACGCTGACGAATT-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis d'introduire un site NdeI ainsi qu'un codon ATG dans la séquence codante de l'apoAIV aux positions respectives 544 et 547, provoquant une délétion de 182 acides aminés du côté N-terminal.

30 A partir d'un clone mutant (pXL1765) dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-BamHI de 579 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a, lui même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL1817 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des 182 premiers acides aminés ($\Delta N182$).

5. Génération des vecteurs pXL1981 et pXL2183, et préparation des polypeptides 5 $P(\Delta h1-2)$ et $P(tag\Delta h1-2)$.

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant : 5'-GCCACAGTGATGTGGCCCTTGCCACCGAG-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis de déléter la partie de la séquence codante de l'apoAJV comprise entre les positions 10 40 et 186, provoquant une délétion de 49 acides aminés, du résidu D14 au résidu 40 et 186, provoquant une délétion de 49 acides aminés, du résidu D14 au résidu V62.

15 A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-BamHI de 990 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a, lui même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL1981 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des hélices 1 et 2 ($\Delta h1-2$).

20 En suivant le protocole décrit en B1.1), le vecteur pXL2183 a été construit à partir du vecteur pXL1981. Le vecteur pXL2183 ainsi obtenu permet d'exprimer à haut niveau le polypeptide $P(\Delta h1-2)$ fusionné en N-terminal au décapeptide MRGS(H)6.

6. Génération des vecteurs pXL1943 et pXL2184, et préparation des polypeptides P($\Delta h7-8$) et P($tag\Delta h7-8$).

25 A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant : 5'-CAGGCCTCGCTGAGGCCCTATGCTCAGGAC-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis de déléter la partie de la séquence codante de l'apoAJV comprise entre les positions 484 et 615 provoquant une délétion de 44 acides aminés, du résidu P162 au résidu 30 A205.

A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-BamHI de 1005 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a.

Le vecteur recombinant pXL1943 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des hélices 7 et 8 ($\Delta h7-8$).

En suivant le protocole décrit en B1.1), le vecteur pXL2184 a été construit à partir du vecteur pXL1943. Le vecteur pXL2184 ainsi obtenu permet d'exprimer à 5 haut niveau le polypeptide P($\Delta h7-8$) fusionné en N-terminal au décapeptide MRGS(H)6.

7. Génération des vecteurs pXL1982 et pXL2215, et préparation des polypeptides P($\Delta h9-10$) et P(tag $\Delta h9-10$).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :
10 5'-CGCCGCAGCCTGGCTCCCTGGCCGAGGAC-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis de déléter la partie de la séquence codante de l'apoAIV comprise entre les positions 616 et 747, provoquant une délétion de 44 acides aminés, du résidu P206 au résidu 15 A249.

A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-BamHI de 1005 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a, lui-même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

20 Le vecteur recombinant pXL1982 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des hélices 9 et 10 ($\Delta h9-10$).

En suivant le protocole décrit en B1.1), le vecteur pXL2215 a été construit à partir du vecteur pXL1982. Le vecteur pXL2215 ainsi obtenu permet d'exprimer à haut niveau le polypeptide P($\Delta h9-10$) fusionné en N-terminal au décapeptide MRGS(H)6.

25 8. Génération du vecteur pXL1986 et préparation du polypeptide P($\Delta h11-12, L87M$).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :
5'-CGGCAGAGGCTGGCGCCCTACGGGGAAAAC-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse 30 a permis de déléter la partie de la séquence codante de l'apoAIV comprise entre les positions 748 et 867, provoquant une délétion de 40 acides aminés, du résidu P250 au résidu D260.

Cette mutation (L->M) a pour effet de changer le codon leucine 87 en méthionine dans la protéine.

5 A partir de ce clone et d'un autre clone ne portant pas la mutation (L->M) supplémentaire, un fragment NdeI-BamHI de 1017 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a, lui même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

Deux vecteurs recombinants ont ainsi été obtenus, dont le vecteur pXL1986 qui permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des hélices 11 et 12 ($\Delta h11-12$) et une méthionine au lieu d'une leucine en position 87 (L87M).

10 En suivant le protocole décrit en B1.1), le vecteur pXL2186 a été construit à partir du vecteur obtenu ci-dessus, codant pour le polypeptide P($\Delta h11-12$). Le vecteur pXL2186 ainsi obtenu permet d'exprimer à haut niveau le polypeptide P($\Delta h11-12$) fusionné en N-terminal au décapeptide MRGS(H)6.

15 9. Génération des vecteurs pXL1987 et pXL2217, et préparation des polypeptides P($\Delta h13-14$) et P(tag $\Delta h13-14$).

A l'aide de l'oligodésoxy nucléotide synthétique phosphorylé suivant :
5'-CGACGCCGGGTGGAGTCCTTCTTCAGCACC-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis de déléter la partie de la séquence codante de l'apoAIV comprise entre les positions 868 et 999, provoquant une délétion de 44 acides aminés, du résidu P290 au résidu N333.

20 25 A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-BamHI de 1005 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a, lui même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL1987 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des hélices 13 et 14 ($\Delta h13-14$).

En suivant le protocole décrit en B1.1), le vecteur pXL2217 a été construit à partir du vecteur pXL1987. Le vecteur pXL2217 ainsi obtenu permet d'exprimer à haut niveau le polypeptide P($\Delta h13-14$) fusionné en N-terminal au décapeptide MRGS(H)6.

B2 : Mutants réalisés à partir du plasmide pXL1696

1. Génération des vecteurs pXL2071 et pXL2185, et préparation des polypeptides P(Δ h5-6) et P(tag Δ h5-6).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :

5 5'-CAGCAGCGCTGGAGCCCCACGCCGACGAG-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1696 (Cf exemple A2) a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis de déléter la partie de la séquence codante de l'apoAIV comprise entre les positions 352 et 483, provoquant une délétion de 44 acides aminés, du résidu P118 au résidu R161.

A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-EcoRI de 432 pb a été purifié, puis ligaturé avec le fragment EcoRI-BamHI isolé du plasmide pXL2051 et le vecteur pET3-a ouvert par les enzymes NdeI et BamHI.

15 Le vecteur recombinant pXL2071 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des hélices 5 et 6 (Δ h5-6).

En suivant le protocole décrit en B1.1), le vecteur pXL2185 a été construit à partir du vecteur pXL2071. Le vecteur pXL2185 ainsi obtenu permet d'exprimer à haut niveau le polypeptide P(Δ h5-6) fusionné en N-terminal au décapeptide MRGS(H)6.

2. Génération du vecteur pXL2063 et préparation du polypeptide P(D5S).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :

5'-GAGGTCAGTGCTAGCCAGGTGGCCACA-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1696 (Cf exemple A2) a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis d'introduire un codon AGC dans la séquence codante de l'apoAIV, provoquant le remplacement de l'acide aspartique par une sérine en position 5.

30 A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-EcoRI de 564 pb a été purifié, puis ligaturé avec le fragment EcoRI-BamHI isolé du plasmide pXL2051 et le vecteur pET3-a ouvert par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXT 2072 . . .

3. Génération du vecteur pXL2069 et préparation du polypeptide P(D5K).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :

5' -GAGGTCAGTGCTAAACAGGTGGCCACA-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1696 (Cf exemple A2) a été réalisée en utilisant 5 le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis d'introduire un codon AAA dans la séquence codante de l'apoAIV, provoquant le remplacement de l'acide aspartique par une lysine en position 5.

10 A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-EcoRI de 564 pb a été purifié, puis ligaturé avec le fragment EcoRI-BamHI isolé du plasmide pXL2051 et le vecteur pET3-a ouvert par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL2069 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une lysine en position 5.

4. Génération du vecteur pXL2062 et préparation du polypeptide P(D44F).

15 A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :

5' -GCCCTCTTCCAGTTCAAACTTGGAGAA-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1696 (Cf exemple A2) a été réalisée en utilisant 20 le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis d'introduire un codon TTC dans la séquence codante de l'apoAIV, provoquant le remplacement de l'acide aspartique par une phénylalanine en position 44.

A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-EcoRI de 564 pb a été purifié, puis ligaturé avec le fragment EcoRI-BamHI isolé du plasmide pXL2051 et le vecteur pET3-a ouvert par les enzymes NdeI et BamHI.

25 Le vecteur recombinant pXL2062 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une phénylalanine en position 44.

5. Génération du vecteur pXL2074 et préparation du polypeptide P(D44A).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :

30 5' -GCCCTCTTCCAGGGCGAAACTTGGAGAA-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1696 (Cf exemple A2) a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les

d'introduire un codon GCG dans la séquence codante de l'apoAIV, provoquant le remplacement de l'acide aspartique par une alanine en position 44.

5 A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-EcoRI de 564 pb a été purifié, puis ligaturé avec le fragment EcoRI-BamHI isolé du plasmide pXL2051 et le vecteur pET3-a ouvert par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL2074 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une alanine en position 44.

B3 : Mutants réalisés à partir du plasmide pXL2051

10 1. Génération du vecteur pXL2073 et préparation du polypeptide P(K178A).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant : 5'-GTGGAGGAGCTCGCGGGACGCCTTACG-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL2051 (Cf exemple A2) a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis d'introduire un codon GCG dans la séquence codante de l'apoAIV, provoquant le remplacement de la lysine par une alanine en position 178.

15 20 A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment EcoRI-BamHI de 572 pb a été purifié, puis ligaturé avec le fragment NdeI-EcoRI isolé du plasmide pXL1696 et le vecteur pET3-a ouvert par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL2073 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une alanine en position 178.

2. Génération du vecteur pXL2070 et préparation du polypeptide P(K178Y).

25 A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant : 5'-GTGGAGGAGCTCTATGGACGCCTTACG-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL2051 (Cf exemple A2) a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis d'introduire un codon TAT dans la séquence codante de l'apoAIV, provoquant le remplacement de la lysine par une tyrosine en position 178.

30 A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL2051 a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis d'introduire un codon TAT dans la séquence codante de l'apoAIV, provoquant le remplacement de la lysine par une tyrosine en position 178.

NdeI-EcoRI isolé du plasmide pXL1696 et le vecteur pET3-a ouvert par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL2070 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une tyrosine en position 178.

5 3. Génération du vecteur pXL2072 et préparation du polypeptide P(E230K).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :

5'-AAGAAAGAACGCCAAAGAGCTCAAGGCCAG-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL2051 (Cf exemple A2) a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis d'introduire un codon AAA dans la séquence codante de l'apoAIV, provoquant le remplacement de l'acide glutamique par une lysine en position 230.

10 15 A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment EcoRI-BamHI de 572 pb a été purifié, puis ligaturé avec le fragment NdeI-EcoRI isolé du plasmide pXL1696 et le vecteur pET3-a ouvert par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL2072 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une lysine en position 230.

B4 : Production des polypeptides décrits dans les parties B1-B3.

20 1. Production : On utilise par exemple la souche BL21 DE3 (pLysS) contenant un plasmide d'expression d'un polypeptide de l'invention tel que décrit dans les parties B1-B3.

25 30 Une préculture de nuit en milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) et du chloramphénicol (50 µg/ml), LBApCm, à 37°C, sert à inoculer au 1/100ème la culture de production (même milieu). La culture est agitée à 37°C jusqu'à une densité optique (mesurée à 610 nm) de 0,5. On ajoute alors de l'IPTG à la concentration finale de 1 mM et les cellules induites pour l'expression de l'ARN polymérase de T7 sont incubées pendant 90 ou 180 min. L'analyse des extraits bactériens par gel d'électrophorèse coloré au bleu de coomassie permet de révéler une accumulation dans les extraits des cultures de 90 min du polypeptide de l'invention. Par ailleurs, ce polypeptide peut être stabilisé par ajout de rifampicine durant la phase de production. Les seuls ARNm

l'ARN polymérase d'E.coli. On peut ajouter par exemple 20 min après l'ajout de l'IPTG de la rifampicine à des concentrations qui peuvent être comprises entre 50 et 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Les cellules qui ne produisent alors plus que le seul ARNm du polypeptide désiré à l'exception de tous les autres sont incubées entre 90 et 180 min à 5 37°C .

Dans ce cas, le polypeptide recombinant produit peut représenter de 20 à 30 % des protéines totales produites par la bactérie. De plus le polypeptide est ainsi accumulé sans dégradation dans la bactérie sous forme soluble.

La production a été extrapolée en fermenteur, par culture haute densité de 10 E.coli en mode Fed-Batch. Cette production a été réalisée dans un fermenteur de 2 litres (Setric) en 2 phases : une phase de croissance du microorganisme jusqu'à une DO600 de 30 à 40 (durée : 5 heures environ). Cette phase est réalisée dans le milieu de fermentation défini par Jung et al. (Ann.Inst.Pasteur/Microbiol. 139 (1988) 129-146) ; puis une phase d'induction de la production, par addition d'IPTG et de 15 rifampicine, et augmentation du débit d'alimentation en substrats carboné et azoté (durée : 1 heure 30 minutes environ).

2. Lyse des cellules et récupération du polypeptide recombinant.

Après la culture de production, les cellules sont collectées puis lysées, par 20 exemple par sonication. A l'échelle du laboratoire, il a été utilisé un sonicateur Branson (modèle B30, Proscience, France) après avoir concentré 30 fois les cellules dans le tampon PBS (KCl 0,2 g/l, KH₂PO₄ 0,2 g/l, NaCl 8 g/l, Na₂HPO₄ 1,25 g/l). Le cassage des cellules est effectué à 4°C en mode continu (2 impulsions de 5 25 minutes). On peut également prétraiter la suspension cellulaire concentrée en présence de Triton X-100 à la température ambiante avant la sonication.

C/ PURIFICATION DES POLYPEPTIDES DE L'INVENTION.

C1. Les polypeptides P(R93G), P(ΔC44) et P(ΔN13) ont été purifiés selon le protocole suivant, qui se déroule en conditions natives et ne requiert aucune étape d'affinité pour les lipides.

30 La culture cellulaire est centrifugée à 6.000 tr/min pendant 30 minutes et le culot est repris à raison de 3 ml par gramme de cellules humides dans le tampon A (Na₂HPO₄ 81 mM, NaH₂PO₄ 19 mM ; EDTA, 2 mM ; PMSF, 1 mM ; pH 7,5 . B-memonté

d'ultrasons (modèle BRANSON réglé à 250W) à 4°C. Les extraits sont centrifugés pendant 30 minutes à 15.000 tr/min à 4°C. Le surnageant S1 est conservé et le culot est lavé dans le même volume de tampon A et recentrifugé dans les mêmes conditions. Le surnageant correspondant S1' est ajouté au surnageant S1.

5 Après un dosage des protéines de la fraction (S1 + S1') est ajoutée une solution aqueuse de sulfate de streptomycine à 10 % à raison de 10 ml de solution par gramme de protéine. Après 15 minutes d'incubation à 4°C sous agitation douce, la suspension est centrifugée pendant 30 minutes à 15.000 tr/min à 4°C. Le surnageant (S2) est récupéré. A cette fraction S2 est ajouté du sulfate d'ammonium (concentration finale : 25 % de saturation). Après 15 minutes d'incubation à 4°C sous agitation, la suspension est centrifugée pendant 30 minutes à 15.000 tr/min à 4°C. Au surnageant S25 est ajouté du sulfate d'ammonium (concentration finale : 50 % de saturation). Après 15 minutes d'incubation à 4°C sous agitation, la suspension est centrifugée pendant 30 min à 15.000 tr/min à 4°C. Le culot (C50) est récupéré et repris dans le tampon B (Tris-HCl, 10 mM ; EDTA, 2 mM ; pH8.8) et dialysé contre 2 l de tampon B que l'on change 5 fois durant 48 heures.

10 15 20 25

Le dialysat est injecté sur une colonne échangeuse d'ions de type QFF (Pharmacia) et élué avec un gradient de NaCl. La détermination des fractions contenant les polypeptides de l'invention est effectuée selon un test en Elisa décrit ci-après. Les fractions intéressantes sont rassemblées et concentrées par précipitation en sulfate d'ammonium (concentration finale : 80 % de saturation). Après 15 minutes d'incubation à 4°C sous agitation, la suspension est centrifugée pendant 30 minutes à 15.000 tr/min à 4°C. Le culot (C80) est récupéré et repris dans le tampon B et dialysé contre 2 l de tampon B.

25 30

Le dialysat est injecté sur une colonne échangeuse d'ions de type Mono Q (Pharmacia) et élué avec un gradient de NaCl. Les fractions intéressantes, identifiées par le test Elisa ci-après décrit et gel SDS 15 %, sont rassemblées et concentrées par précipitation en sulfate d'ammonium (concentration finale : 80 % de saturation). Après 15 minutes d'incubation à 4°C sous agitation, la suspension est centrifugée et reprise dans le tampon D (sulfate d'ammonium, 1,7 M ; Na_2HPO_4 8,1 mM, NaH_2PO_4 1,9 mM ; EDTA, 2 mM ; pH 7,4) et dialysée contre 2 l de tampon D.

Le dialysat est injecté sur une colonne de chromatographie d'interactions hydrophobes Phényl-sépharose (Pharmacia) et élué avec le tampon E (Na_2HPO_4 8,1 mM ; NaH_2PO_4 1,9 mM ; EDTA, 2 mM ; pH 7,4). Les fractions intéressantes sont identifiées par test Elisa.

Brièvement, le test ELISA mis au point consiste à adsorber sur une plaque avec un sérum polyclonal de lapin dirigé contre l'apoAIV humaine (dilué au 1/1000ème), saturer cette plaque à la gélatine, incuber l'échantillon à tester et enfin, faire réagir un mélange équimolaire de deux anticorps monoclonaux dirigés contre l'apoAIV (MO3 et MO5, SERLIA, Institut Pasteur de Lille), suivi d'une révélation immunoenzymatique à l'aide d'un sérum polyclonal anti-souris couplé à la peroxydase. Ce test est facilement étalonné avec une gamme de dilutions de l'apoAIV plasmatique.

5 Ces fractions sont rassemblées et dialysées contre le tampon F (sulfate d'ammonium, 40 % de saturation ; Na_2HPO_4 8,1 mM ; NaH_2PO_4 1,9 mM ; EDTA, 10 2 mM ; pH 7,4) et conservées à 4°C.

10 C2. Pour les polypeptides P($\Delta h1-2$), P($\Delta h5-6$), P($\Delta h13-14$) et P($\Delta N182$), la fraction S2 est directement injectée sur colonne de type QFF (sans précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium) équilibrée en tampon B. Le polypeptide est exclu 15 (P($\Delta N182$)) ou élué avec un palier à 250 mM NaCl en tampon B (P($\Delta h1-2$)). Le polypeptide est ensuite concentré par précipitation en sulfate d'ammonium (concentration finale 50 % de la saturation pour P($\Delta h1-2$), 10 % pour P($\Delta N182$)). La purification de P($\Delta h1-2$) est terminée par une centrifugation (30 min., 4°C, 10 000 g). Le culot est récupéré, repris en tampon PBS, désalé sur colonne de gel-filtration PD10 (Pharmacia) et séché à - 20°C. Le polypeptide P($\Delta N182$) précipité au sulfate d'ammonium est injecté sur une colonne de chromatographie d'interactions hydrophobes phényl-sépharose (Pharmacia) et élué avec le tampon B. Le polypeptide 20 est identifié par gel de polyacrylamide SDS, et les fractions intéressantes sont rassemblées et dialysées contre le tampon B et conservées à 4°C.

25 C3. Les polypeptides P(tag $\Delta N13$), P(tag $\Delta C44$), P(tag $\Delta h1-2$), P(tag $\Delta h7-8$), P(tag $\Delta h9-10$), P(tag $\Delta h11-12$), P(tag $\Delta h13-14$) et P(tag $\Delta h5-6$) ont été purifiés selon le protocole suivant, qui ne comprend qu'une seule étape.

30 La culture cellulaire est centrifugée à 6.000 tr/min pendant 30 minutes et le culot est repris à raison de 3 ml par gramme de cellules humides dans le tampon A (Na_2HPO_4 81 mM, NaH_2PO_4 19 mM ; EDTA, 2 mM ; PMSF, 1 mM ; pH 7,5 ; β -mercaptoéthanol 10 mM). La suspension est traitée par 3 cycles de 5 minutes d'ultrasons (modèle BRANSON réglé à 250W) à 4°C. Les extraits sont centrifugés pendant 1h à 11.000 g à 4°C. Les acides nucléiques présents dans le surnageant ont été précipités par addition de 10% (w/v) de sulfate de streptomycine (10 ml/g protein), incubation 30 min. à 4°C, puis recentrifugé dans les mêmes conditions 35 précédemment.

Les protéines recombinantes présentes dans le surnageant ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur ion métallique chélaté. La purification a été effectuée sur résine agarose-acide nitrilotriacétique-nickel (NTA-Ni) selon les recommandations du fabricant, avec les modifications suivantes : La solution protéique est désalée sur une colonne Tris-Acryl GF-05 équilibrée avec un tampon phosphate 100 mM pH 8. Les fractions protéiques récoltées sont réunies, diluées dans le même tampon phosphate jusqu'à une concentration finale de 4 mg/ml, et supplémentées de Hecameg (poudre), concentration finale 25 mM. Le mélange a ensuite été chargé sur une colonne Ni-NTA équilibrée avec le même tampon phosphate contenant 25 mM de Hecameg. Aucune protéine fixée n'a été éluee par lavage de la colonne avec le même tampon. Les protéines faiblement liées ont été élues par un tampon phosphate/citrate pH 6, et les protéines recombinantes, par un tampon phosphate/citrate pH 5. Les fractions protéiques obtenues à pH 5 ont été neutralisées par addition de soude 1M (30 µl/ml) et supplémentées de 2 inhibiteurs de protéases : EDTA 0,1M et PMSF 0,2M. Les fractions ont ensuite été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) contenant 15% d'acrylamide/bis-acrylamide, selon Laemmli (Nature 227 (1970) 680), puis regroupées selon la pureté et la quantité. Les fractions regroupées ont été incubées en présence de L(-)-histidine poudre (concentration finale 50 mM), pendant 1h à 4°C, afin de détruire la liaison Ni-poly-His-protéine. Le nickel et l'histidine libérés ont ensuite été éliminés par desalage sur colonne Tris-Acryl GF-05 équilibrée avec un tampon phosphate pH 7,4 contenant 2mM EDTA.

Les protéines recombinantes ainsi purifiées ont été analysées par électrophorèse SDS-PAGE et immunoblotting. L'immunoblotting a été réalisé avec un mélange d'anticorps monoclonaux anti-ApoAIV conjugués à la peroxydase, et d'anticorps de chèvre anti-souris conjugués à la peroxydase. L'activité peroxydase liée a été révélée par incubation avec une solution de 4-Chloro-1-Naphtol comme substrat.

Les différents chromatogrammes ont été suivis par détection UV à 280 nm. La concentration en protéine a été déterminée selon la technique de Bradford (Anal.Biochem. 72 (1976) 248).

D/ CARACTERISATION BIOLOGIQUE DES POLYPEPTIDES DE L'INVENTION.

5 L'activité biologique des polypeptides de l'invention a été évaluée principalement sur la base de 2 paramètres : leur affinité pour le récepteur HDL et leur effet sur l'efflux du cholestérol. Ces 2 paramètres rendent compte du potentiel pharmacologique hypocholestérolémiant des polypeptides de l'invention. Le protocole de détermination de ces paramètres est donné ci-après ainsi que les résultats obtenus.

1. Protocoles de mesure.

10 a) Affinité pour le récepteur HDL

15 Les polypeptides purifiés sont utilisés dans un premier temps pour reconstituer des protéoliposomes avec du DMPC, dont la structure apparaît identique, au vu du comportement en chromatographie d'exclusion, à celle des protéoliposomes reconstitués avec de l'apoAIV native. Ces protéoliposomes reconstitués sont ensuite testés pour leur capacité de se fixer à des adipocytes murins (lignée Ob177) selon un protocole déjà décrit.

b) Efflux du cholestérol

20 L'efflux du cholestérol à partir de cellules adipocytaires murines (lignée Ob177) provoqué par les protéoliposomes DMPC-polypeptides de l'invention est déterminé après 5 heures d'incubation.

25 2. Résultats

Polypeptide	Kd(%)	Bmax(%)	Efflux à 5h (%)*
ApoAIV	100**	100**	28
P(R93G)	115	97	27,5
P(Δ h1-2)	105	94	25,5
P(Δ C44)	nd	nd	32
P(Δ N13)	96	94	24

(*) Exprimé en % du cholestérol initial des cellules chargées, l'efflux de base obtenu en présence de DPMC seul après 5 heures est de 11%.

30 (***) Réalisé sur trois expériences indépendantes

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

5 (A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
 (B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
 (C) VILLE: ANTONY
 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 92165

10 (ii) TITRE DE L' INVENTION: NOUVEAUX POLYPEPTIDES, LEUR PREPARATION ET
 LEUR UTILISATION.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 6

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

15 (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(v) DONNEES DE LA DEMANDE ACTUELLE:
 NUMERO DE DEPOT: EP 92402301.3

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 1134 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

30 (A) ORGANISME: Sequence nucléotidique de l'apolipoprotéine
 AIV

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 1..1134

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: Boucle
 (B) EMPLACEMENT: 40..120

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
(A) NOM/CLE: Boucle
(B) EMPLACEMENT: 121..186

5 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
(A) NOM/CLE: Boucle
(B) EMPLACEMENT: 187..285

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
(A) NOM/CLE: Boucle
(B) EMPLACEMENT: 286..351

10 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
(A) NOM/CLE: Boucle
(B) EMPLACEMENT: 352..417

15 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
(A) NOM/CLE: Boucle
(B) EMPLACEMENT: 418..483

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
(A) NOM/CLE: Boucle
(B) EMPLACEMENT: 484..549

20 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
(A) NOM/CLE: Boucle
(B) EMPLACEMENT: 550..615

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
(A) NOM/CLE: Boucle
(B) EMPLACEMENT: 616..681

25 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
(A) NOM/CLE: Boucle
(B) EMPLACEMENT: 682..747

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
(A) NOM/CLE: Boucle
(B) EMPLACEMENT: 748..801

30 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
(A) NOM/CLE: Boucle
(B) EMPLACEMENT: 802..866

35 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
(A) NOM/CLE: Boucle
(B) EMPLACEMENT: 867..933

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
(A) NOM/CLE: Boucle
(B) EMPLACEMENT: 934..999

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: Boucle

(B) EMPLACEMENT: 1000..1131

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

5	ATG GAG GTC AGT GCT GAC CAG GTG GCC ACA GTG ATG TGG GAC TAC TAC Met Glu Val Ser Ala Asp Gln Val Ala Thr Val Met Trp Asp Tyr Phe	48
	1 5 10 15	
10	AGC CAG CTG AGC AAC AAT GCC AAG GAG GCC GTG GAA CAT CTC CAG AAA Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ala Lys Glu Ala Val Glu His Leu Gln Lys	96
	20 25 30	
15	TCT GAA CTC ACC CAG CAA CTC AAT GCC CTC TTC CAG GAC AAA CTT GGA Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Asn Ala Leu Phe Gln Asp Lys Leu Gly	144
	35 40 45	
20	GAA GTG AAC ACT TAC GCA GGT GAC CTG CAG AAG AAG CTG GTG CCC TTT Glu Val Asn Thr Tyr Ala Gly Asp Leu Gln Lys Lys Leu Val Pro Phe	192
	50 55 60	
25	GCC ACC GAG CTG CAT GAA CGC CTG GCC AAG GAC TCG GAG AAA CTG AAG Ala Thr Glu Leu His Glu Arg Leu Ala Lys Asp Ser Glu Lys Leu Lys	240
	65 70 75 80	
30	GAG GAG ATT GGG AAG GAG CTG GAG GAG CTG AGG GCC CGG CTG CTG CCC Glu Glu Ile Gly Lys Glu Leu Glu Leu Arg Ala Arg Leu Leu Pro	288
	85 90 95	
35	CAT GCC AAT GAG GTG AGC CAG AAG ATC GGG GAC AAC CTG CGA GAG CTT His Ala Asn Glu Val Ser Gln Lys Ile Gly Asp Asn Leu Arg Glu Leu	336
	100 105 110	
40	CAG CAG CGC CTG GAG CCC TAC GCG GAC CAG CTG CGC ACC CAG GTC AAC Gln Gln Arg Leu Glu Pro Tyr Ala Asp Gln Leu Arg Thr Gln Val Asn	384
	115 120 125	
45	ACG CAG GCC GAG CAG CTG CGG CGC CAG CTG ACC CCC TAC GCA CAG CGC Thr Gln Ala Glu Gln Leu Arg Arg Gln Leu Thr Pro Tyr Ala Gln Arg	432
	130 135 140	
50	ATG GAG AGA GTG CTG CGG GAG AAC GCC GAC AGC CTG CAG GCC TCG CTG Met Glu Arg Val Leu Arg Glu Asn Ala Asp Ser Leu Gln Ala Ser Leu	480
	145 150 155 160	
55	AGG CCC CAC GCC GAC GAG CTC AAG GCC AAG ATC GAC CAG AAC GTG GAG Arg Pro His Ala Asp Glu Leu Lys Ala Lys Ile Asp Gln Asn Val Glu	528
	165 170 175	
60	GAG CTC AAG GGA CGC CTT ACG CCC TAC GCT GAC GAA TTC AAA GTC AAG Glu Leu Lys Gly Arg Leu Thr Pro Tyr Ala Asp Glu Phe Lys Val Lys	576
	180 185 190	
65	ATT GAC CAG ACC GTG GAG GAG CTG CGC CGC AGC CTG GCT CCC TAT GCT Ile Asp Gln Thr Val Glu Glu Leu Arg Arg Ser Leu Ala Pro Tyr Ala	624
	195 200 205	
70	CAG GAC ACG CAG GAG AAG CTC AAC CAC CAG CTT GAG GGC CTG ACC TTC Gln Asp Thr Gln Glu Lys Leu Asn His Gln Leu Glu Gly Leu Thr Phe	672
	210 215	

CAG ATG AAG AAG AAC GCC GAG GAG CTC AAG GCC AGG ATC TCG GCC AGT 225 Gln Met Lys Lys Asn Ala Glu Glu Leu Lys Ala Arg Ile Ser Ala Ser 230 235 240	720
5 GCC GAG GAG CTG CGG CAG AGG CTG GCG CCC TTG GCC GAG GAC GTG CGT Ala Glu Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Pro Leu Ala Glu Asp Val Arg 245 250 255	768
10 GGC AAC CTG AGG GGC AAC ACC GAG GGG CTG CAG AAG TCA CTG GCA GAG Gly Asn Leu Arg Gly Asn Thr Glu Gly Leu Gln Lys Ser Leu Ala Glu 260 265 270	816
15 CTG GGT GGG CAC CTG GAC CAG CAG GTG GAG GAG TTC CGA CGC CGG GTG Leu Gly Gly His Leu Asp Gln Gln Val Glu Glu Phe Arg Arg Arg Val 275 280 285	864
20 GAG CCC TAC GGG GAA AAC TTC AAC AAA GCC CTG GTG CAG CAG ATG GAA Glu Pro Tyr Gly Glu Asn Phe Asn Lys Ala Leu Val Gln Gln Met Glu 290 295 300	912
25 CAG CTC AGG CAG AAA CTG GGC CCC CAT GCG GGG GAC GTG GAA GGC CAC Gln Leu Arg Gln Lys Leu Gly Pro His Ala Gly Asp Val Glu Gly His 305 310 315 320	960
30 AGC ACC TTC AAG GAG AAA GAG AGC CAG GAC AAG ACT CTC TCC CTC CCT Ser Thr Phe Lys Glu Lys Glu Ser Gln Asp Lys Thr Leu Ser Leu Pro 340 345 350 355	1008
35 GAG CTG GAG CAA CAG CAG GAA CAG CAG CAG GAG CAG CAG GAG CAG Glu Leu Glu Gln Gln Glu Gln Gln Gln Glu Gln Gln Glu Gln 355 360 365	1056
40 GTG CAG ATG CTG GCC CCT TTG GAG AGC TG Val Gln Met Leu Ala Pro Leu Glu Ser 370 375	1104
	1134

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 377 acides amin.s
 (B) TYPE: acide amin.
 (D) CONFIGURATION: lin,aire

50 (ii) TYPE DE MOLECULE: prot,ine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Glu Val Ser Ala Asp Gln Val Ala Thr Val Met Trp Asp Tyr Phe
 1 5 10 15
 55 Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ala Lys Glu Ala Val Glu His Leu Gln Lys
 20 25 30
 60 Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Asn Ala Leu Phe

Glu Val Asn Thr Tyr Ala Gly Asp Leu Gln Lys Lys Leu Val Pro Phe
 50 55 60
 Ala Thr Glu Leu His Glu Arg Leu Ala Lys Asp Ser Glu Lys Leu Lys
 65 70 75 80
 Glu Glu Ile Gly Lys Glu Leu Glu Leu Arg Ala Arg Leu Leu Pro
 85 90 95
 10 His Ala Asn Glu Val Ser Gln Lys Ile Gly Asp Asn Leu Arg Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gln Arg Leu Glu Pro Tyr Ala Asp Gln Leu Arg Thr Gln Val Asn
 115 120 125
 Thr Gln Ala Glu Gln Leu Arg Arg Gln Leu Thr Pro Tyr Ala Gln Arg
 130 135 140
 20 Met Glu Arg Val Leu Arg Glu Asn Ala Asp Ser Leu Gln Ala Ser Leu
 145 150 155 160
 Arg Pro His Ala Asp Glu Leu Lys Ala Lys Ile Asp Gln Asn Val Glu
 165 170 175
 25 Glu Leu Lys Gly Arg Leu Thr Pro Tyr Ala Asp Glu Phe Lys Val Lys
 180 185 190
 Ile Asp Gln Thr Val Glu Glu Leu Arg Arg Ser Leu Ala Pro Tyr Ala
 195 200 205
 30 Gln Asp Thr Gln Glu Lys Leu Asn His Gln Leu Glu Gly Leu Thr Phe
 210 215 220
 35 Gln Met Lys Lys Asn Ala Glu Glu Leu Lys Ala Arg Ile Ser Ala Ser
 225 230 235 240
 Ala Glu Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Pro Leu Ala Glu Asp Val Arg
 245 250 255
 40 Gly Asn Leu Arg Gly Asn Thr Glu Gly Leu Gln Lys Ser Leu Ala Glu
 260 265 270
 Leu Gly Gly His Leu Asp Gln Gln Val Glu Glu Phe Arg Arg Arg Val
 275 280 285
 45 Glu Pro Tyr Gly Glu Asn Phe Asn Lys Ala Leu Val Gln Gln Met Glu
 290 295 300
 50 Gln Leu Arg Gln Lys Leu Gly Pro His Ala Gly Asp Val Glu Gly His
 305 310 315 320
 Leu Ser Phe Leu Glu Lys Asp Leu Arg Asp Lys Val Asn Ser Phe Phe
 325 330 335
 55 Ser Thr Phe Lys Glu Lys Glu Ser Gln Asp Lys Thr Leu Ser Leu Pro
 340 345 350
 Glu Leu Glu Gln Gln Glu Gln Gln Gln Glu Gln Gln Gln Glu Gln
 355 360 365
 60 Val Gln Met Leu Ala Pro Leu Glu Ser
 370 375

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 84 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN_c

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

15 (iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: OLIGONUCLEOTIDE A

20 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CTAGACATAT GGAGGTCAGT GCTGACCAGG TGGCCACAGT GATGTGGGAC TACTTCAGCC
 25 AGCTGAGCAA CAATGCCAAG GAGG 60

84

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 94 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN_c

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

40 (vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide B

45 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CCGTGGAACA TCTCCAGAAA TCTGAACCTCA CCCAGCAACT CAATGCCCTC TTCCAGGACA
 AACTTGGAGA AGTGAACACT TACGCAGGTG ACCG 60

94

50 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 86 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

10 (vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: OLIGONUCLEOTIDE C

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CCACGGCCTC CTTGGCATTG TTGCTCAGCT GGCTGAAGTA GTCCCACATC ACTGTGGCCA 60
 CCTGGTCAGC ACTGACCTCC ATATGT

20 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 92 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

30 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: OLIGONUCLEOTIDE D

35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

40 AATTGGTCA CCTGCGTAAG TGTTCACCTC TCCAAGTTG TCCTGGAAGA GGGCATTGAG 60
 TTGCTGGGTG AGTTCAAGATT TCTGGAGATG TT

REVENDICATIONS

1. Polypeptide dérivé de l'apolipoprotéine AIV humaine caractérisé en ce qu'il comprend, par rapport à la séquence de l'apolipoprotéine AIV humaine SEQ ID n° 2, au moins une des modifications suivantes :
 - 5 (a) une mutation ponctuelle portant sur un résidu fonctionnel, et/ou,
 - (b) une délétion d'une extrémité terminale d'au moins 10 acides aminés, et/ou,
 - (c) une délétion d'une hélice ou d'une paire d'hélices, et/ou,
 - (d) une partie additionnelle hétérologue possédant une activité biologique différente ou complémentaire de celle de l'apoAIV, ou une propriété de marqueur, de cibleur ou de stabilisateur.
- 10 2. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend au moins une modification selon (a) et (b).
- 15 3. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend au moins une modification selon (a) et (c).
4. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend une modification selon (a), (b) ou (c) associée à une modification selon (d).
- 20 5. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que le résidu fonctionnel est choisi parmi les résidus chargés, les résidus sites de glycosylation et les résidus impliqués dans des ponts disulfure.
- 25 6. Polypeptide selon la revendication 5 caractérisé en ce que le résidu fonctionnel est choisi parmi les résidus suivants : acide aspartique en position 5, 44, 106, 153 ; glutamine en position 37, 194 ; asparagine en position 39 ; lysine en position 73, 84, 103, 169, 178 ; acide glutamique en position 76, 81, 87, 99, 131, 164, 187, 230 ; alanine en position 22 ; proline en position 139, 161 ; et serine en position 154.
- 30 7. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les polypeptides suivants décrits dans les exemples : P(ΔN13,R93G), P(ΔN13), P(tagΔN13), P(R93G), P(ΔC44), P(tagΔC44), P(ΔC194), P(ΔN182), P(Δh1-2), P(tagΔh1-2), P(Δh7-8), P(tagΔh7-8), P(Δh9-10), P(tagΔh9-10), P(Δh11-12), P(tagΔh11-12), P(Δh11-12,L87M), P(Δh13-14), P(tagΔh13-14), P(Δh15-16)

P(tagΔh5-6), P(D44F), P(D44A), P(D5S), P(D5K), P(K178Y), P(K178A), et P(E230K).

8. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

5 9. Séquence nucléotidique selon la revendication 8 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une séquence d'ADNc, d'ADNg, d'ARN ou d'une séquence synthétique ou semi-synthétique.

10. Séquence nucléotidique selon la revendication 9 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une séquence d'ADNc.

10 11. Vecteur comprenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 8 à 10.

12. Cellule recombinante contenant un vecteur selon la revendication 11.

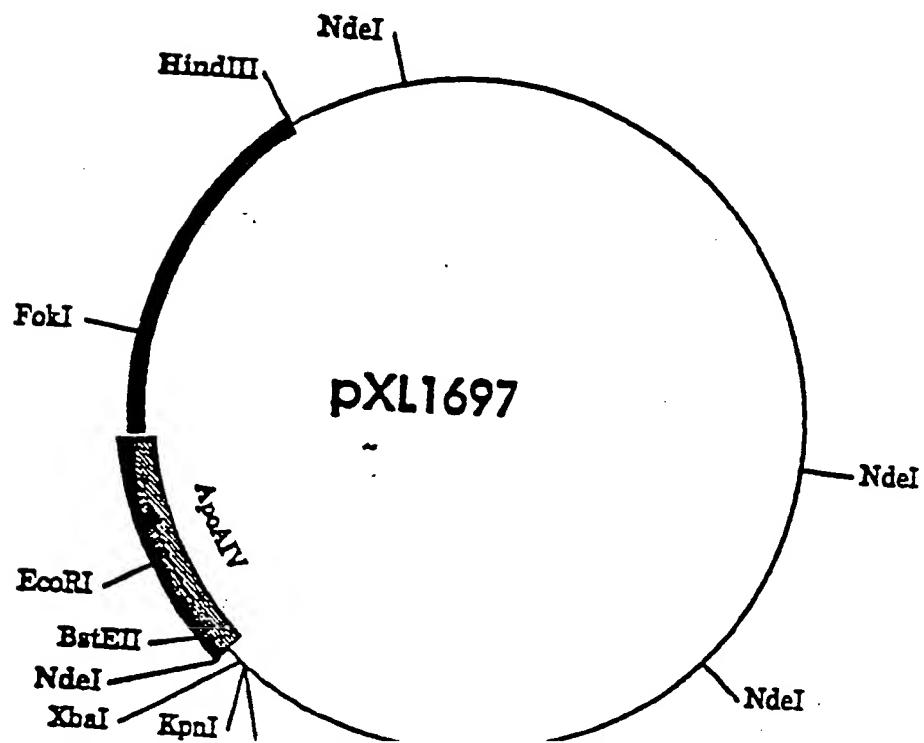
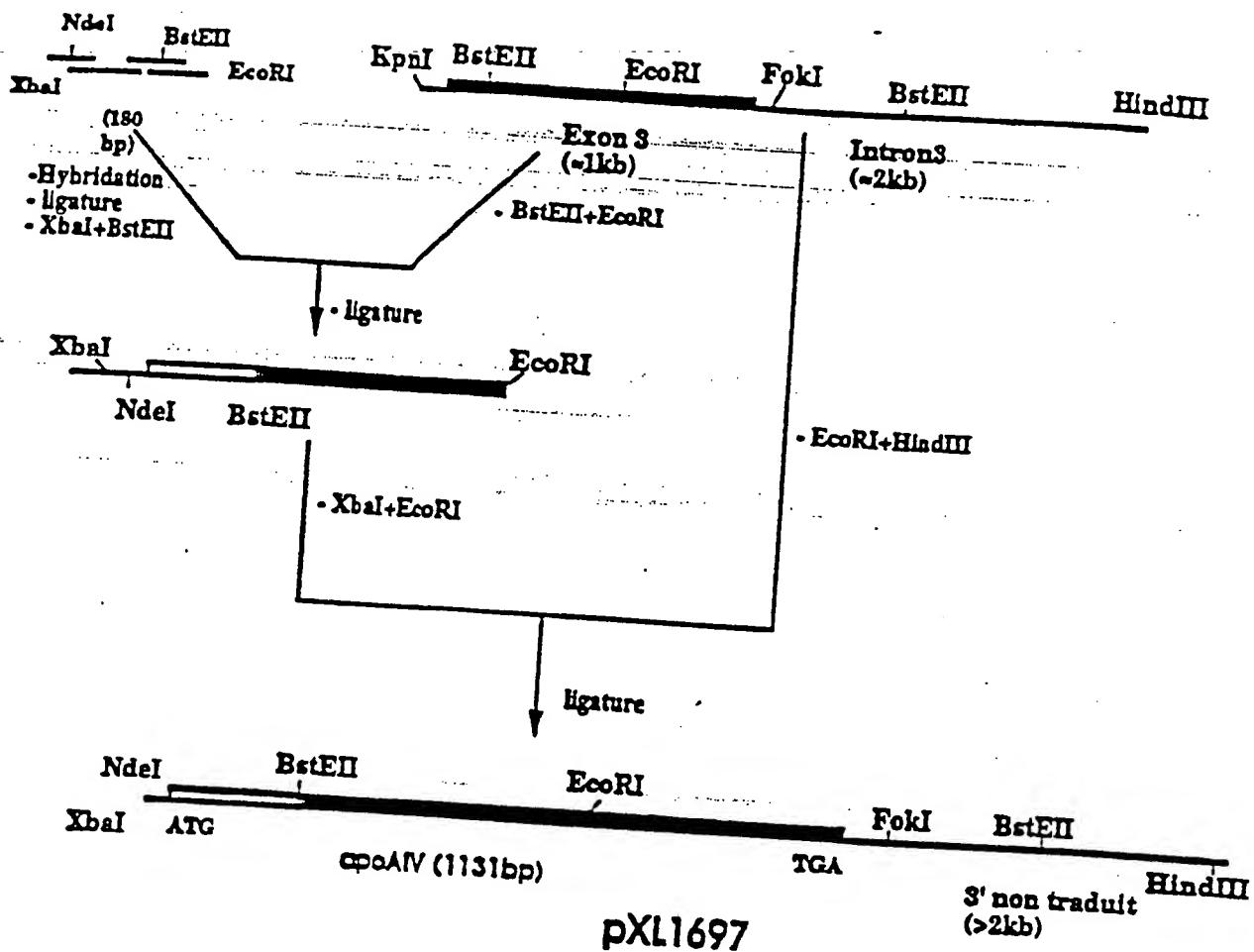
15 13. Procédé de préparation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule recombinante selon la revendication 12 et on récupère le polypeptide produit.

20 14. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 pour la préparation de molécules non peptidiques ou non exclusivement peptidiques actives pharmacologiquement sur les niveaux plasmatiques de cholestérol, par détermination des éléments structuraux de ce polypeptide qui sont importants pour son activité, et reproduction de ces éléments par des structures non-peptidiques ou non exclusivement peptidiques.

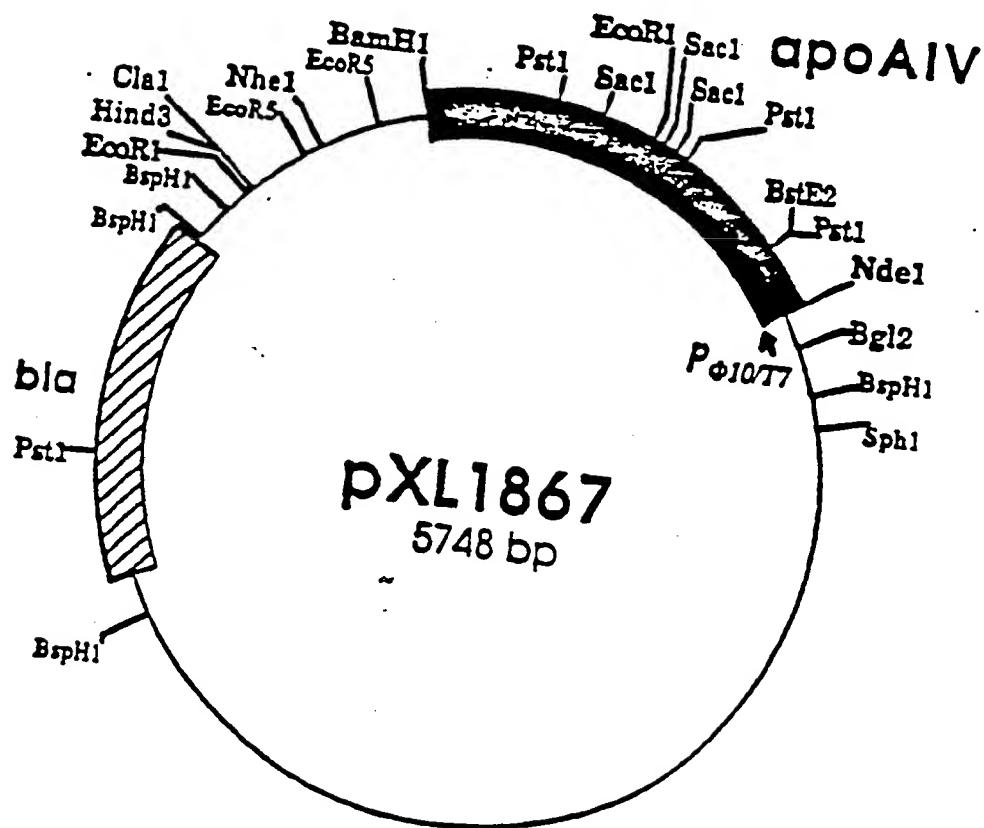
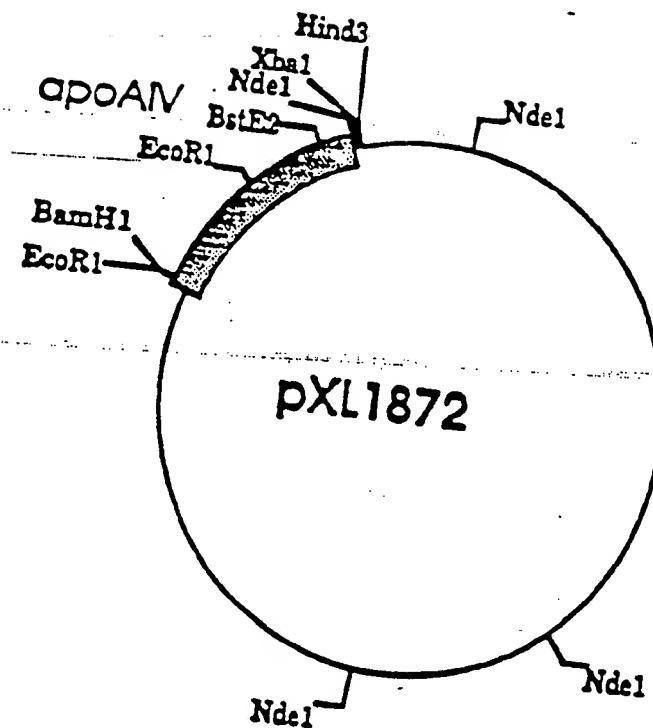
25 15. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, ou une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 8 à 10, ou une ou plusieurs molécules préparées selon la revendication 14.

16. Composition selon la revendication 15 destinée au traitement ou à la prévention des affections liées aux hypercholestérolémies.

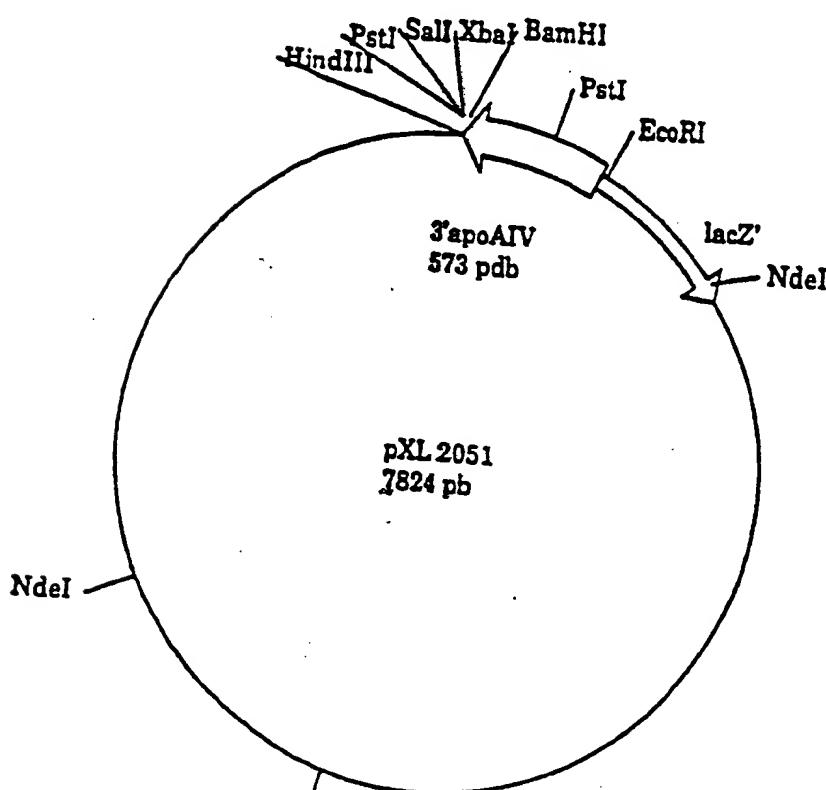
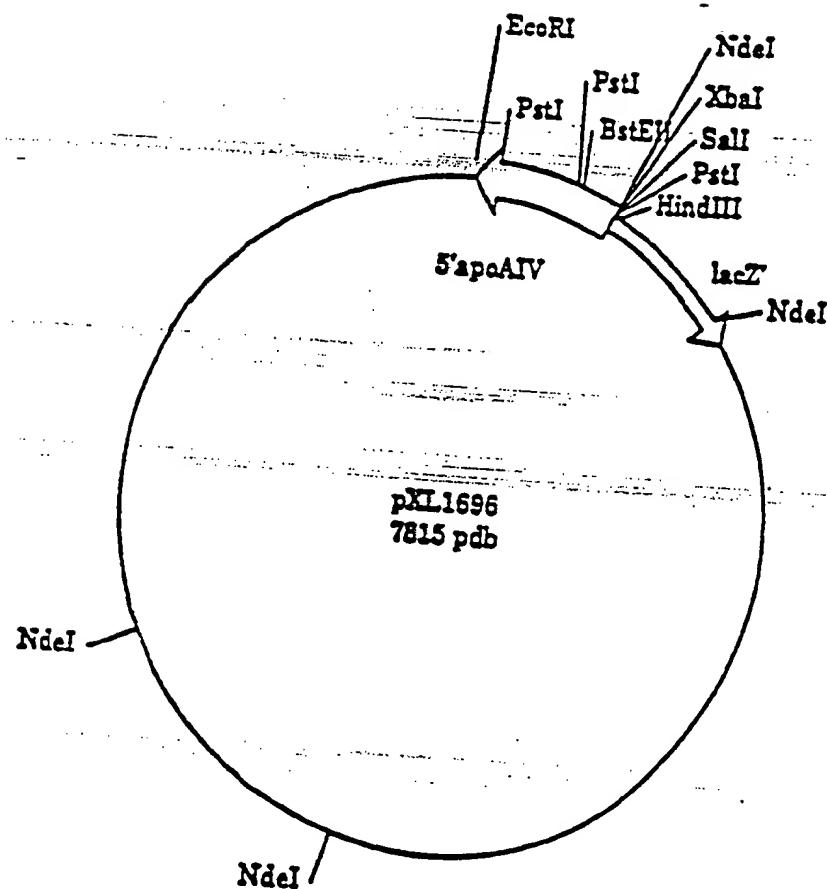
17. Composition selon la revendication 16 destinée au ralentissement de la formation de plaques d'athéromé, et/ou à la régression des plaques d'athéromé et/ou à la diminution des risques d'accidents coronariens.



2/3



3/3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR93/00073

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. 5 : C12N 15/12; C12N 15/62; C12N 15/63; C07K 15/00 C07K 15/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int. Cl. 5 : C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 262, No. 17, 15 June 1987, BALTIMORE MD US pages 7973-7981 NABIL A. ELSOURBAGY ET AL. 'Structure and expression of the human apolipoprotein A-IV gene' see the whole document	1,3-5 7-13 15-17
Y	WO, A, 9 012 879 (SIRTORI, CESARE ET AL.) 1 November 1990, see page 4, lines 10-27	1,3-5, 7-13,15-17
Y	BIOTECHNOLOGY Vol. 6, No.11, November 1988, NEW YORK US pages 1321-1325 E. HOCHULI ET AL. 'genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent' cited in the application see page 1321, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, paragraph 1	7

Further documents are listed in the continuation of Box C

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 June 1993 (18.06.93)

Date of mailing of the international search report

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9300073
SA 69970

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 18/06/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9012879	01-11-90	AU-A- 5424590 EP-A- 0469017	16-11-90 05-02-92

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 93/00073

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷
 Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 C12N15/12; C12N15/62; C12N15/63; C07K15/00
 C12P21/02; A61K37/02

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Système de classification	Documentation minimale consultée ⁸	Symboles de classification
	Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹	
CIB 5	C07K	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS¹⁰

Catégorie ¹¹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications vues ¹⁴
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY vol. 262, no. 17, 15 Juin 1987, BALTIMORE, MD US pages 7973 - 7981 NABIL A. ELSOURBAGY ET AL. 'Structure and expression of the human apolipoprotein A-IV gene' voir le document en entier --- WO,A,9 012 879 (SIRTORI, CESARE ET AL.) 1 Novembre 1990 voir page 4, ligne 10 - ligne 27 ---	1,3-5, 7-13, 15-17
Y	---	1,3-5, 7-13, 15-17
		-/-

¹¹ Catégories spéciales de documents cités¹¹

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) dans le document

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 JUIN 1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02 -07- 1993

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁴(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie ^o	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
Y	<p>BIOTECHNOLOGY</p> <p>vol. 6, no. 11, Novembre 1988, NEW YORK US pages 1321 - 1325</p> <p>E. HOCHULI ET AL. 'genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent'</p> <p>cité dans la demande voir page 1321, colonne de gauche, alinéa 1 - colonne de droite, alinéa 1</p> <p>-----</p>	7

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9300073
SA 69970

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

18/06/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevét(s)	Date de publication
WO-A-9012879	01-11-90	AU-A- 5424590 EP-A- 0469017	16-11-90 05-02-92